

**DAS VERHALTEN DER EINZELNEN EJAKULATFRAKTIONEN BEI
DER KRYOKONSERVIERUNG VON SPLIT-EJAKULATEN**

von

Abolghassem Nurbachsch

aus

Kerman/Iran

Aus der Frauenklinik
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. med. K. G. Ober

DAS VERHALTEN DER EINZELNEN EJAKULATFRAKTIONEN BEI DER KRYOKONSERVIERUNG VON SPLIT-EJAKULATEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Abolghassem Nurbachsch
aus
Kerman/Iran

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



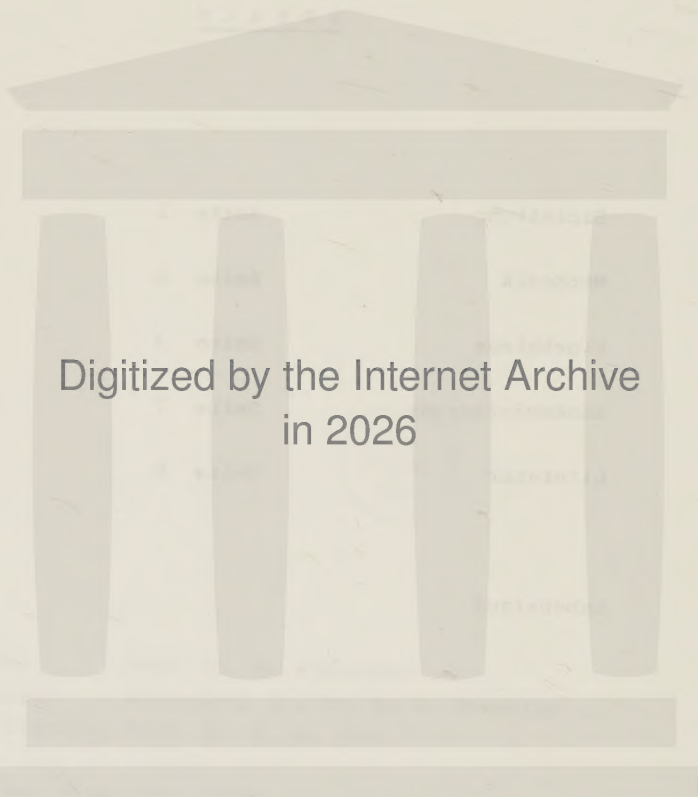
Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer
Referent: Priv.-Doz. Dr. Dr. K. G. Bregulla
Korreferent: Prof. Dr. K. G. Ober

Tag der mündlichen Prüfung: 08. März 1976

I N H A L T

Einleitung	Seite 1
Methodik	Seite 2
Ergebnisse	Seite 3
Zusammenfassung	Seite 7
Literatur	Seite 8

Lebenslauf



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543128_0044

Seit die Möglichkeit der Gefrierkonservierung von Keimzellen bekannt ist, sind Verfahren für die Kryokonservierung ständig erweitert und verfeinert worden. An dem Sinn solcher Versuche wird heute keiner mehr zweifeln, wenn man allein die Erfolge, die die Veterinärmediziner erreicht haben, bedenkt. In der Humanmedizin ist die Gefrierkonservierung des Blutes oder anderer Organteile heute wichtiger als die Konservierung menschlicher Keimzellen in tiefer Kälte. Solche Indikationen könnten sich nicht nur durch Verbesserung der Einfrierergebnisse wandeln; gelegentlich ergeben sich in der Zukunft auch Möglichkeiten für die Anwendung, die heute nur bedingt vorstellbar sind.

Die Gefrierkonservierung menschlicher Ejakulate wird seit etwa 10 Jahren zunehmend geübt. Die Poolung des Samens für die heterologe und homologe Insemination zur Behandlung steril verheirateter Ehepaare dürfte die häufigste Ursache dafür sein (1, 11, 12). Letztlich interessiert bei der Kryokonservierung die Anhäufung möglichst vieler Keimzellen auf einem geringen Raum. Die Qualität des Kryospermas läßt sich durch die Vitalität der Zellen nach dem Auftauen bestimmen.

Für ein optimales Ergebnis sind viele Variable bei dem Einfrier- und Auftauvorgang zu beachten (12). Einfriergeschwindigkeiten in Abhängigkeit von den gegebenen Temperaturen, die Zusammensetzung der protektiven Medien und die Auftaugeschwindigkeiten sind entscheidend. Inwieweit bei der Kryokonservierung menschlicher Ejakulate das Samenplasma die Ergebnisse beeinflusst, war bisher nicht bekannt. Das sollte hier untersucht werden.

Ejakulate lassen sich in ihre einzelnen Fraktionen, die Samenzellen und das Samenplasma, durch verschiedene Methoden trennen. Die sicherste Labormethode ist dafür das Zentrifugieren der Ejakulate. Die beim Zentrifugieren auf die Samenzelle wirksam werdenden Kräfte haben bei den für die Trennung guten g-Zahlen den Nachteil der Zellschädigung. Wird ein Ejakulat als Split-Ejakulat gewonnen, so bleiben die Samenzellen in ihrer Vitalität völlig unbeeinflusst. Diese Art der Ejakulatteilung wurde für die Untersuchung genutzt (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9).

Methodik

3 Spender im Alter von 18 bis 32 Jahren haben nach einer Karenzzeit von 1 bis 14 Tagen Ejakulate für die Untersuchung durch Masturbation gespendet. Der Samen wurde mit der Ejakulation versucht, in zwei gleichgroße Fraktionen zu teilen. Nach der Bestimmung des Volumens, der Zellzahl und der Motilität (Ausgangsmotilität = AM) kam zu beiden Fraktionen als protektive Substanz tropfenweise Nagase-Verdünner (10) im Verhältnis 1:1 hinzu. Bei +5°C geschah in 10 Minuten die Adaption. Während der Adaptionszeit entstand durch eine dem Volumen entsprechenden Entnahme aus 1. und 2. Fraktion eine 3. Fraktion. Alle drei Ejakulatportionen froren dann zu Pellet-Kryosperma auf vorgeformten Kohlensäureschneepplatten bei -76°C ein. Die Volumina der einzelnen Pellets lagen bei 0,07 ml. Nach dem Durchfrieren der Sperma-Pellets wurden sie etwa 5 min später in flüssigen Stickstoff umgelagert. Bei

einer Lagerungsdauer von durchschnittlich 1 Woche wurden die Pellets bei $+37^{\circ}\text{C}$ umgebender Raumtemperatur aufgetaut und die Endmotilität bestimmt. Von jeder Ejakulationsportion wurden 5 Pellets ausgezählt und jede Zählung dreifach wiederholt, um einen guten Mittelwert zu erhalten.

Ergebnisse

Die Daten der 3 dreifach geteilten Ejakulate sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Spender	I. Split-Fraktion					II. Split-Fraktion					I.+II. Split-Fraktion	
	Vol/ml	Sp/mill/ml	AM %	EM %	Rc	Vol/ml	Sp/mill/ml	AM %	EM %	Rc	EM %	Rc
A	0,7	285	71	29	41	0,8	153	72	30	42	31	44
B	0,9	71	66	21	32	0,4	21	65	18	28	19	29
C	0,8	155	65	23	35	0,6	46	66	21	32	23	36
Σ =					36					34		36

Die Zahlen der Tabelle zeigen deutlich die Reduzierung der Zellzahl pro ml Ejakulat durch die Split-Ejakulat-Technik für die 2. Fraktion. Bei einer weiteren oder vom Volumen ungleichen Fraktionierung wären wahrscheinlich noch höhere Samenzellkonzentrationen in der 1. Portion zu erwarten. Das scheint nach den Werten anderer Untersucher wahrscheinlich (4). Bei gleicher Anfangs- und Endmotilität ist aber in allen drei Fraktionen durch die Kryokonservierung kein für die einzelnen Fraktionen typischer unterschiedlicher Motilitätsverlust nachweisbar, der die bei der Split-Technik zuletzt abgegebenen Samenfäden stärker treffen würde als die Samenzellen in der 1. Fraktion. Auch das zusätzliche Zumischen von Spermaplasma in der 3. Fraktion, bei der durch eine Volumenzunahme eine Mindering der Samenzellen pro ml Sperma erreicht wurde, schien die Motilität nicht zu beeinträchtigen. Die 3. Fraktion entspräche bei einem nicht-geteilten Ejakulat dem eigentlichen Nativsperma.

Nachdem die in diesen Vorversuchen ermittelten Werte gleiche Tendenzen zeigten, wurde auf die separate Aufarbeitung der 2. Fraktion verzichtet und das Verhalten der Motilität durch eine Verdünnung mit dem Samenplasma an einer größeren Gruppe von Spender-Ejakulaten beobachtet. Bei gleichen andrologischen Kriterien, wie sie für die erste Untersuchungsreihe beschrieben wurden, konnten 20 unausgesuchte geteilte Ejakulate so zu Sperma-Pellets aufgearbeitet werden, daß wieder die erste samenzellreiche Fraktion durch Zumischen des Nagase-Verdünners im Verhältnis 1:1 für das Einfrieren entstand und als 2. Fraktion ein volumenentsprechendes Gemisch beider Splitteile übrig blieb. Die 2. Fraktion entsprach damit dem eigentlichen Nativ-

sperma und enthielt im Vergleich zur 1. Fraktion wesentlich mehr Samenplasma. Dazu kam dann für das Einfrieren noch der Nagase-Verdünner. Die einzelnen Spermaportionen waren wieder 0,07 ml groß und kamen nach dem Einfrieren als Sperma-Pellets zur Lagerung in einen mit flüssigen Stickstoff gefüllten Container. Innerhalb von 1. Woche wurden alle Sperma-Pellets bei $+37^{\circ}\text{C}$ umgebender Lufttemperatur aufgetaut und die Endmotilität in den verschiedenen Proben bestimmt.

Die Werte von Ausgangs- und Endmotilität sind in Tabelle 2 eingetragen.

Spender	I. Split-Fraktion					II. Split-Fraktion		I.+II. Split-Fraktion	
	Vol/ml	Sp/mill/ml	AM %	EM %	Rc	Vol/ml	Sp/mill/ml	EM %	Rc
A	1,8	46	76	64	84	0,2	18	62	82
B	0,8	28	20	11	52	0,5	9	3	16
C	1,5	3	-	-	-	0,4	0	-	-
D	2,0	30	62	30	49	0,2	0	30	48
E	1,2	22	80	37	46	0,8	3	37	46
F	1,4	255	60	24	40	1,0	77	23	39
G	1,3	20	58	25	43	0,7	6	27	46
H	1,2	31	70	29	42	0,5	1	32	46
I	1,0	123	81	46	57	0,4	31	43	52
J	1,0	443	80	44	54	0,8	81	45	57
K	0,9	89	80	44	55	0,4	24	39	50
L	2,2	35	75	38	50	1,0	2	36	48
M	1,5	30	63	16	26	0,2	2	17	27
N	1,0	259	52	14	27	0,2	26	18	34
O	1,0	41	67	19	28	1,0	18	23	34
P	1,5	92	81	52	64	0,9	4	55	68
Q	2,0	218	67	38	57	1,3	8	42	63
R	0,7	152	59	29	50	0,3	7	17	28
S	1,5	28	78	10	12	0,5	2	10	13
T	0,7	140	76	28	38	0,5	39	29	38
Σ					46				44

Die bereits in Tab. 1 sich abzeichnende Tendenz, daß keine auffallenden Motilitätsunterschiede bei der Kryokonservierung einzelner Split-Ejakulatfraktionen des gleichen Sponders zu erkennen sind, läßt sich hier mit dem Vorzeichentest sichern. Danach wäre, soweit es die Eigenschaften der Samenfäden für die Möglichkeit der Gefrierung betrifft, unwichtig, ob sie aus der 1. oder 2. Fraktion stammen, d. h. die gesamte Anzahl der Spermien eines Ejakulates eignen sich gleichgut für die Kryokonservierung. Durch die Split-Technik läßt sich eine eindeutige Konzentrierung, soweit es die Anzahl der Samenfäden pro ml im Kryosperma betrifft, erreichen. Da diese Daten die Lagerungskapazitäten im Container und wahrscheinlich auch die Befruchtungsrate nach der Insemination betreffen, würde man für die Kryokonservierung menschlichen Spermias die Ausnutzung der Konzentrierung durch die Splittechnik empfehlen.

Zusammenfassung

Die schonendste Art, Samenzellen und Samenplasma eines Ejakulates zu trennen, um eine zellreiche Fraktion zu bekommen, gelingt durch die Split-Technik. Sie ist seit etwa 30 Jahren bekannt, wird aber von Andrologen und Gynäkologen nur selten genutzt, um etwa bei der Insemination günstigere Bedingungen zu schaffen.

Für die Kryokonservierung interessierte das Verhalten der einzelnen Split-Fraktionen nach dem Einfrier- und Auftauvorgang. Nach orientierenden Untersuchungen an 3 dreigeteilten Ejakulaten wurden dann 20 Ejakulate unausgesuchter Spender in jeweils 3 verschiedenen Fraktionen aufgearbeitet. Der tabellarische Vergleich der Ergebnisse zeigt, daß bei einer Anreicherung der Samenzellen in der 1. Fraktion sich durch die Gefrierkonservierung kein Motilitätsunterschied zu den anderen Fraktionen ergibt. Danach würde die Split-Technik für die Kryokonservierung keine Verbesserung der Motilitätsraten im Vergleich zu nicht-geteilten Ejakulaten bringen. Mit diesem Verfahren kann aber eine Konzentrierung der Spermien pro ml erreicht werden. Das scheint bei der notwendigen Verdünnung mit den protektiven Substanzen, für die Lagerkapazität und die Insemination nicht unbedeutend.

1. Amelar, R.D.
R.S.Hotchkiss
The split ejaculate. Its use in the management of male infertility.
Fertil. Steril. 16, 46 (1965)
2. Broesike, G.
Über die Entleerung und Beschaffenheit der menschlichen Samenflüssigkeit.
Arch.f.mikr.Anat. 78, 128 (1911)
3. Eliasson, R.
Standards for investigation of human semen.
Andrologie 3, 49 (1971)
4. Eliasson, R.
C.Lindholmer
Distribution and properties of spermatozoa in different fractions of split ejaculates.
Fertil. Steril. 24, 521 (1973)
5. Farris, E.J.
D.P.Murphy
The characteristics of the two parts of the partitioned ejaculate and the advantages of its use for intrauterine insemination.
Fertil. Steril. 11, 46 (1965)
6. Harvey, C.
M.H.Jackson
A method of concentrating spermatozoa in human semen.
J. Clin. Path. 8, 341 (1955)
7. Harvey, C.
The use of partitioned ejaculates in investigating the role of accessory secretions in human semen.
Stud. Fertil. 8, 3 (1956)
8. Lindholmer, C.
Survival of human spermatozoa in different fractions of split ejaculates.
Fertil. Steril. 24, 521 (1973)
9. McLeod, J.
R.S.Hotchkiss
The distribution of spermatozoa and of certain chemical constituents in the human ejaculate.
J. Urol. 48, 225 (1942)
10. Nagase, A.
E.F.Graham
Pelleted semen: Comparison of different extenders and processes on fertility of bovine spermatozoa.
V. Int.Congr.Anim.Reprod.& A.I., Trento 4, 387

11. Tyler, E. The clinical use of frozen semen banks.
Fertil. Steril. 24, 413 (1973)
12. Vasterling, H.W. Die künstliche Besamung beim Menschen.
In: Paufler, S.K. u.Mitarb.,
Künstliche Besamung und Eitransplan-
tation bei Tier und Mensch. Bd.I, 156-
Hannover, M.&H. Schaper 1974. 186

Lebenslauf

Ich wurde am 23.3.1936 als viertes und letztes Kind des Geistlichen Mahmud Nurbachschi und seiner Ehefrau Robabeh in Kerman / Iran geboren.

Die Schule besuchte ich zunächst in Kerman und anschließend in Teheran, wo ich 1956 an der Oberrealschule Khaghani das Abitur absolvierte. Dann folgte das Studium der Iranistik und Psychologie in Teheran. Anschließend Medizinstudium in Frankfurt/M. und Erlangen. Medizinisches Staatsexamen Okt. 1969 an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.

Als Medizinalassistent war ich in Rüdeshelm/Rh. und in Erlangen tätig.

Seit 1. Nov. 1970 bin ich zur Facharztweiterbildung an der Universitäts-Frauenklinik Erlangen angestellt.

Erlangen, im März 1976

Abolghassem Nurbachschi

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990